

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Rencana penelitian yang akan digunakan adalah penelitian secara *in silico*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan di Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Ilmu Kesehatan Unniversitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.3.1 Kriteria Pencarian Reseptor Obat

1. Kriteria Inklusi

- 1) Nama obat dapat ditemukan di PDB
- 2) Nama obat yg tercantum di PDB masuk dalam golongan *Homo Sapiens*
- 3) Nama obat tercantum dalam daftar pustaka (Jurnal penelitian, BPOM)
- 4) Golongan obat mengacu berdasarkan JNC VIII (2014)

2. Kriteria Eksklusi

- 1) Nama obat tidak ditemukan di PDB
- 2) Nama obat tidak termasuk dalam golongan *Homo Sapiens*
- 3) Nama obat tidak tercantum dalam daftar pustaka (Jurnal penelitian, buku, dan sebagainya)
- 4) Golongan obat tidak tercantum pada JNC VIII (2014)

4.3.2 Kriteria Kandungan Senyawa Tanaman

1. Kriteria

- 1) Nama senyawa kandungan tercantum dalam daftar pustaka (Jurnal penelitian)
- 2) Nama senyawa dapat ditemukan strukturnya di PubChem

2. Kriteria Senyawa yang tidak digunakan

- 1) Nama senyawa kandungan tidak tercantum dalam daftar pustaka Jurnal penelitian)
- 2) Nama senyawa tidak dapat ditemukan strukturnya di PubChem.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat Penelitian

1. Perangkat Keras

Asus dengan processor AMD A8-7410 APU dan AMD Radeon R5 Graphics 2.20 GHz dan memori 4,00 (3,41 GB yang dapat dipakai).

2. Perangkat Lunak

Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini berupa :

- 1) AutoDock Vina
- 2) Biova Discovery Studio
- 3) Avogadro
- 4) PubChem
- 5) PDB (*Protein Data Bank*)
- 6) PASW *Statistics* 18
- 7) Biovia Draw 2017 R2

4.4.2 Bahan Penelitian

1. Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman

Kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman akan disiapkan dalam setelah diunduh dari PubChem kemudian diubah formatnya menjadi PDB *File* dengan menggunakan Avogadro (kandungan senyawa tanaman dapat dilihat pada Lampiran 4).

2. Reseptor Target

Reseptor target merupakan suatu syarat pada pengujian *docking* dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina. Pada pengujian *docking* dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina. Digunakan ID PDB. ID PDB terdiri dari 4 karakter (contoh: 2YDM) yang merupakan sebuah kode reseptor obat yang dapat dibaca oleh AutoDock Vina, reseptor obat dapat dilihat pada tabel IV.1.

Tabel IV. 1 ID PDB Golongan Obat

No	Golongan Obat			Nama Obat	ID PDB
1	Angiotensin Inhibitors (ACEIs)	Converting Enzyme		Captopril	2YDM

No	Golongan Obat	Nama Obat	ID PDB
2	Angiotensin Reseptor Blockers (ARBs)	Olmesartan	4ZUD
3	Beta Blockers (BBs)	Timolol	3D4S

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Preparasi Ligan dan Reseptor

Pada penelitian ini terdapat masing-masing senyawa tanaman sejumlah 22 dan 65 dan reseptor obat sebanyak 3 golongan obat antihipertensi yang dapat dicari dengan mengakses PDB, ligan yang di unduh harus kompleks. Sedangkan untuk preparasi senyawa yang akan diuji dengan AutoDock Vina membutuhkan data yang dapat diperoleh dengan mengakses PubChem dan Avogadro *Software*. Berikut adalah penjelasan langkah-langkahnya:

1. PubChem

- 1) Dicari senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang akan diuji dengan mengakses <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- 2) Diklik compound pada kolom Go, kemudian tulis nama senyawa (contoh: quercetine) yang akan dicari pada kolom Go.
- 3) Setelah hasil pencarian muncul, diklik nama senyawa.
- 4) Diklik download dan pilih penyimpanan bentuk 3D conformer.

2. Avogadro Software

- 1) Dimasukkan *file* yang telah diunduh pada PubChem ke Avogadro *Software*.
- 2) Setelah muncul struktur diklik *extensions* kemudian *molecular mechanics* lalu setup force dan ubah menjadi MMFF94 untuk *minimize energy*.
- 3) Dilakukan optimasi bentuk geometri senyawa dengan cara memilih *extensions* lalu pilih *Optimize Geometry*.
- 4) Kemudian disimpan struktur dalam bentuk pdb.

3. Protein Data Bank (PDB)

- 1) Dicari reseptor masing-masing obat golongan anti hipertensi.

- 2) Dibuka website resmi PDB yaitu <https://www.rcsb.org>, kemudian tuliskan nama reseptor (contoh: Captopril) pada kolom Go, klik Go.
- 3) Setelah hasil pencarian muncul, diklik Homo sapiens only pada kolom kiri Organism atau mencari spesies yang setara dengan mamalia.
- 4) Dilihat pada kolom ligan, pastikan struktur ligand sesuai dengan senyawa obat.
- 5) Diklik *download files* pada pojok kanan atas *welcome* lalu pilih PDB format, kemudian *save file*.

4.5.2 Pemisahan Ligan dan Reseptor

Reseptor yang diunduh dari PDB berupa kompleks dengan ligand yang harus dipisahkan menggunakan *Discovery Studio*, dan harus dipisahkan dari residu-residu yang dapat mengganggu proses *docking* agar tidak mempengaruhi hasil. Pertama-tama akan dilakukan pemilihan ligan yang akan dilanjutkan dengan pemilihan reseptor, berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Pemilihan Ligan

- 1) Dibuka file PDB yang telah di unduh dengan *Discovery Studio* yang akan tampak gambar 3D.
- 2) Kemudian dalam *view hirarcy* akan dipilihnya unsur-unsur ligan yang tersedia.
- 3) Disimpan ligan dengan cara klik *Save as* lalu beri nama ligan.

2. Pemilihan Reseptor

- 1) Dibuka kembali file PDB yang telah di unduh dengan *Discovery Studio* yang akan tampak gambar 3D.
- 2) Kemudian dalam *view hirarcy* akan dipilih unsur-unsur reseptor yang tersedia.
- 3) Disimpan reseptor dengan cara klik *Save as* lalu beri nama reseptor.

4.5.3 Preparasi Reseptor dan Ligan

Sebelum dilakukan *docking* perlu dilakukan penyiapan senyawa obat dan reseptor yang terlibat lalu disimpan dengan format dan penyimpanan folder yang

telah ditentukan untuk mempermudah tahap selanjutnya. Berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Preparasi Reseptor

- 1) Dibuka program AutoDock Vina *File* lalu masukan *file* reseptor yang telah dipisahkan menggunakan Discovery Studio.
- 2) Diedit *Startup Directory*, sesuaikan dengan *directory* atau alamat folder kerja. Digunakan untuk memilih *file* pada folder yang telah ditentukan sebelumnya.
- 3) Kemudian dipilih *Read Molecule* lalu *Grid* klik *Select Molecule* untuk memilih reseptor yang akan disimpan.
- 4) Disimpan reseptor dalam bentuk *pdbqt file* pada folder yang sama dengan sebelumnya, lalu ditekan *Save* dengan demikian, preparasi reseptor telah selesai.

2. Preparasi Ligan

- 1) Masih dalam program AutoDock Vina, dipilih *file ligand* untuk menampilkan ligan.
- 2) Kemudian diklik *Grid* diklik *Choose Ligand* untuk memilih ligan yang akan disimpan.
- 3) disimpan ligan dalam bentuk *pdbqt file* pada folder yang sama dengan sebelumnya, lalu ditekan *save as pdbqt*.

3. Dibuat File Konfigurasi

- 1) Dilakukan penentuan koordinat penambatan dengan dilakukan pengaturan *Grid box* untuk menjangkau radius disekitar ligan dengan cara dipilih ligan lalu *select ligand* dan *grid box* kemudian simpan hasil rancangan *grid box* agar dapat terbaca untuk pembuatan *file* konfigurasi.
- 2) Kemudian dibuka *file* konfigurasi pada folder kerja yang sudah tersimpan secara otomatis dengan nama *file config*.
- 3) Setelah itu ditambahkan *exhaustiveness* dalam kelipatan 8 (antara 8 – 64) untuk meningkatkan ketelitian dalam pencarian jika diperlukan lalu *file* disimpan.

- 4) Disimpan rancangan ukuran *grid box* untuk pembuatan file konfigurasi pada tahap *docking* senyawa uji.

4.5.4 Validasi Metode *Docking*

Tahap selanjutnya ditujukan untuk memvalidasi kelompok pembanding (reseptor obat) yang sebelumnya sudah dilakukan preparasi untuk melanjutkan langkah berikutnya yaitu *docking* senyawa metabolit dari tumbuhan. Berikut langkah validasi metode *docking*:

1. Pada folder penyimpanan dibuka *command prompt* dengan cara *Open commmand window here* yang berisikan *script* mengenai lokasi instalasi *software* AutoDock Vina dan *script* menjalankan *docking*, *script* perintahnya yaitu `—config config.txt —log log.txt`.
2. Setelah ditekan *enter*, proses *docking* akan mulai berjalan dan ditunggu hingga proses 100%.
3. Jika proses sudah selesai, buka folder kerja, maka akan terdapat 2 *file* yaitu Log berisi hasil *docking* dan *pdabt_out* berisi konformasi ligan setelah *docking* yang terdapat beberapa konformasi.
4. Untuk memisahkan beberapa konformasi hasil *docking* tersebut, *script* perintahnya adalah `—input ligan_out.pdabt`.
5. Setelah itu kembali lagi pada Discovery Studio untuk melihat struktur kimia yang berupa hasil pemisahan konformasi ligan dengan cara memasukan *file* konformasi dan ligan pada tahap awal yang dilakukan pemisahan dalam format *pdabt* kemudian dilihat kemiripan posisi bentuk struktur ligan obat.
6. Selanjutnya dilihat nilai RMSD dengan cara memilih ikon *structure* lalu pilih RMSD All atoms. Validasi *docking* dikatakan valid apabila nilai RMSD yaitu jarak rata-rata antar *reference* dengan ligan hasil *docking* adalah kurang dari 2 (Megantara, 2014).

4.5.5 *Docking* Ligan Senyawa Pembanding dan Senyawa Uji

Setelah memvalidasi metode *docking* tahap selanjutnya dilakukan *docking* senyawa metabolit sekunder tanaman yang akan diuji dengan reseptor obat

antihipertensi serta docking senyawa pembanding dengan reseptor obat berikut adalah langkah-langkahnya:

1. Membuka program AutoDock Vina yang telah disiapkan dengan reseptor dalam bentuk pdb kemudian diubah menjadi pdbqt.
2. Dilakukan penentuan koordinat penambatan yang sama dengan koordinat (x,y,z) sebelumnya.
3. Lalu dimasukan ligan yang sudah dipreparasi dengan Avogadro dalam format pdb lalu diubah dalam bentuk pdbqt.
4. Kemudian membuat file konfigurasi seperti tahap sebelumnya.
5. Dilakukan proses docking senyawa tumbuhan dengan reseptor yang dipilih menggunakan metode yang sama pada tahap sebelumnya dengan replikasi sebanyak 3 kali.
6. Setelah itu dilakukan pemisahan *konformasi hasil docking* tersebut, *script perintahnya adalah* —input ligansenyawa_out.pdbqt untuk digunakan pada tahap visualisasi.

Tahap selanjutnya dari proses *docking* adalah dengan melihat konformasi kompleks reseptor-ligan hasil *docking*. Nilai yang dilihat adalah nilai energi afinitas (kkal/mol). Ligan yang memiliki nilai energi afinitas kecil maka ligan tersebut memiliki afinitas yang tinggi dan sebaliknya afinitas yang rendah memiliki nilai energi afinitas yang tinggi (Rachmania, 2015).

Semakin negatif nilai energi afinitas menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara ligan dan reseptor, sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat (Syahputra, dkk, 2014).

4.5.6 Uji Statistik ANOVA

Hasil *binding affinity* atau energi afinitas yang telah direplikasi sebanyak 3 kali kemudian diolah menggunakan perangkat lunak PASW *Statistics* 18 dengan metode analisis *One Way ANOVA* ($p < 0,05$). Metode ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna nilai *binding affinity* antara ligan pembanding dengan ligan senyawa tanaman.

4.5.7 Visualisasi Hasil *Docking*

Visualisasi hasil *docking* dilakukan menggunakan aplikasi Discovery Studio dengan tujuan melihat interaksi ligan uji dengan reseptor target secara 2D dan 3D. Adapun parameter yang dilihat yaitu residu asam amino, jenis ikatan dan gugus farmakofor. Berikut langkah-langkahnya:

1. Dibuka aplikasi Discovery Studio kemudian dimasukkan reseptor dalam bentuk pdbqt.
2. Dimasukkan ligan dalam bentuk pdbqt di tab yang berbeda
3. Di copy ligan tersebut ke dalam tab reseptor
4. Dipilih ikon *define ligand* kemudian *Show 2D* dan akan terlihat jenis ikatan dan residu asam amino yang berikatan.
5. Ditekan ligan kemudian dipilih ikon *ligand interaction* untuk menampilkan interaksi antara ligan dan reseptor dalam bentuk 3D.
6. Pada tahap analisis gugus farmakofor, penomoran gugus senyawa dilakukan pada perangkat lunak BIOVIA Draw 2017 R2